

AperTO - Archivio Istituzionale Open Access dell'Università di Torino

Nanoparticles of therapeutic agents having low water solubility

This is the author's manuscript

Original Citation:

Availability:

This version is available <http://hdl.handle.net/2318/76363> since

Terms of use:

Open Access

Anyone can freely access the full text of works made available as "Open Access". Works made available under a Creative Commons license can be used according to the terms and conditions of said license. Use of all other works requires consent of the right holder (author or publisher) if not exempted from copyright protection by the applicable law.

(Article begins on next page)

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
11 juin 2009 (11.06.2009)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2009/071850 A2

(51) Classification internationale des brevets :

A61K 9/14 (2006.01) A61K 38/28 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/16 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)

(FR). **DOSIO, Franco** [IT/IT]; 24 via Rondissone, I-10155
Torino (IT). **CATTEL, Luigi** [IT/IT]; 54 Strada Eremo,
I-10020 Pecetto (IT).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2008/052147

(22) Date de dépôt international :

27 novembre 2008 (27.11.2008)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

0708296 27 novembre 2007 (27.11.2007) FR

(71) **Déposants** (pour tous les États désignés sauf US) : **UNIVERSITE PARIS SUD VI** [FR/FR]; 15 avenue Georges
Clémenceau, F-91405 Orsay (FR). **STELLA, Barbara**
[IT/IT]; 168p. Le Costantino il Grande, I-10134 Torino
(IT).

(72) **Inventeurs; et**

(75) **Inventeurs/Déposants** (pour US seulement) : **CENTRE
NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**
[FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75016 Paris Cedex 16 (FR).
COUVREUR, Patrick [FR/FR]; 1 bis rue du Lac Léman,
F-91140 Villebon Sur Yvette (FR). **LAKKIREDDY, Hari-
vardhan, Reddy** [IN/FR]; 8 rue Caron, F-92240 Malakoff

(74) **Mandataire** : **LE COUPANEC, Pascale**; 3 rue de
Penthièvre, F-75008 Paris (FR).

(81) **États désignés** (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) **États désignés** (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

(54) **Title:** NANOPARTICLES OF THERAPEUTIC AGENTS HAVING LOW WATER SOLUBILITY

(54) **Titre :** NANOPARTICULES D'ACTIFS THERAPEUTIQUES DE FAIBLE SOLUBILITE AQUEUSE

(57) **Abstract:** The invention relates to a water-dispersible derivative of a therapeutic agent having a low water solubility that comprises at least one molecule of said agent covalently bonded to at least one molecule of a hydrocarbon derivative having a squalenic structure or the like. The invention further relates to corresponding nanoparticles.

(57) **Abrégé :** La présente invention concerne un dérivé hydrodispersible d'un actif thérapeutique de faible solubilité aqueuse formé d'au moins une molécule dudit actif couplée de manière covalente à au moins une molécule d'un dérivé hydrocarboné à structure squalénique ou analogue. Elle vise en outre des nanoparticules correspondantes.

WO 2009/071850 A2

Nanoparticules d'actifs thérapeutiques de faible solubilité aqueuse

La présente invention vise à proposer des formulations nanoparticulaires hydrodispersibles d'actifs thérapeutiques de faible solubilité aqueuse, voire hydrophobes.

D'une manière générale, un actif est dit faiblement hydrosoluble lorsqu'il
5 présente une solubilité dans l'eau pure inférieure à 100 µg/ml à température ambiante c'est-à-dire une température de 25 °C environ.

Ainsi, comme décrit ci-après, de nombreux actifs thérapeutiques et/ou de candidats thérapeutiques s'avèrent faiblement hydrosolubles, voire totalement hydrophobes ce qui pose des difficultés notables sur le plan de leur formulation
10 thérapeutique. Notamment, il s'avère très difficile de les formuler sous une forme compatible avec une administration par voie systémique.

Certes, leur solubilisation en milieu aqueux peut, pour certains d'entre eux, être acquise sous réserve de les formuler à l'état de sels organiques ou inorganiques.

Toutefois, ces sels ou encore dérivés, ne sont pas, dans la plupart des cas,
15 facilement accessibles en terme de synthèse et, d'autre part, pas toujours souhaités. En effet, leur préparation peut se faire au détriment de la stabilité de la molécule active.

A titre illustratif de ces actifs thérapeutiques peu hydrosolubles, on peut notamment citer les cyclosporines, les taxoïdes, les taxanes et des molécules peptidiques à l'image par exemple de l'insuline.

20 Les cyclosporines sont des composés anti-fongiques, dotés généralement d'une activité d'immunosuppresseur. Ces cyclosporines manifestent le plus souvent une solubilité aqueuse n'excédant pas 25 µg/ml, soit une valeur qui est approximativement cent fois inférieure à celle requise pour une absorption régulière par l'organisme. Pour obtenir une biodisponibilité acceptable en cyclosporine, les formulations
25 conventionnelles mettent généralement en œuvre des systèmes de dispersion associant une phase hydrophile, une phase hydrophobe et un tensioactif.

Pour leur part, les taxoïdes ou taxanes, connus pour leurs propriétés anti-néoplasiques, sont des substances diterpéniques. Le paclitaxel qui est un taxoïde naturel, et son dérivé semi-synthétique, le docétaxel, sont largement utilisés pour le traitement des
30 tumeurs. Les dérivés de taxane possèdent, d'une manière générale, une solubilité aqueuse encore inférieure à celle des cyclosporines. Ainsi, cette très faible solubilité aqueuse a nécessité l'élaboration de formulations spécifiques. Par exemple, la formulation de

paclitaxel, distribuée sous la dénomination TAXOL[®] par BRISTOL MEYERS SQUIBB et dédiée à une administration par voie systémique, est une formule stérile, non pyrogénique disponible en dose unique contenant 30 mg de docétaxel anhydre. Outre, l'actif, chaque dose contient du triricinolate de polyoxyéthylène glycol, le Crémophore EL[®] et de l'éthanol. Enfin, ce type de formulation nécessite d'être dilué dans une solution de perfusion (chlorure de sodium 0,9 %, glucose 5 % etc.) stérile, apyrogène et isotonique avant administration.

Or, la présence de Crémophore EL[®] et d'éthanol, qui sont nécessaires pour pallier au défaut de solubilité du paclitaxel, sont malheureusement de nature à causer des effets indésirables. Ainsi, pour prévenir tout risque de manifestation d'hypersensibilité secondaire, il est généralement procédé à une prémédication du sujet à traiter avec de la dexaméthasone par voie orale, trois jours avant l'initialisation de la chimiothérapie.

Une autre alternative de formulation du paclitaxel met en œuvre le paclitaxel lié à de l'albumine. Cette formulation spécifique est commercialisée sous la dénomination Abraxane[®]. Pour des raisons évidentes, cette alternative n'est également pas satisfaisante dans la mesure où elle impose la formation de ce dérivé, par liaison covalente d'une molécule d'albumine à une molécule de paclitaxel. Qui plus est, on ne peut totalement exclure que ce couplage ait une incidence sur l'activité thérapeutique du paclitaxel.

Enfin, il est clair que ce défaut de biodisponibilité des actifs faiblement hydrosolubles, devient un handicap exacerbé lorsque l'actif est destiné à être administré par voie orale, autre voie particulièrement appréciée pour l'administration d'actifs thérapeutiques.

La présente invention vise précisément à préparer un nouveau mode de formulation d'actifs thérapeutiques faiblement hydrosolubles permettant de suppléer aux inconvénients des formulations conventionnelles de tels actifs.

La présente invention résulte plus particulièrement de l'observation par les inventeurs qu'il s'avère possible de formuler ces actifs thérapeutiques, faiblement hydrosolubles voire hydrophobes, à l'état de nanoparticules en suspension dans un milieu aqueux et de taille réduite, notamment compatible pour une administration par voie injectable, sous réserve d'associer ces actifs à un dérivé squalénique ou analogue.

Ainsi, la présente invention concerne selon un premier aspect, un dérivé hydrodispersible d'un actif thérapeutique de faible solubilité aqueuse formé d'au moins une molécule dudit actif couplée de manière covalente à au moins une molécule d'un composé hydrocarboné à structure squalénique ou analogue.

5 Plus précisément, la présente invention concerne un dérivé hydrodispersible précité dans lequel l'actif thérapeutique mis en œuvre possède une solubilité inférieure à 100 µg/ml dans de l'eau pure mesurée à température ambiante, en particulier inférieure à 25 µg/ml, notamment inférieure à 20 µg/ml, voire inférieure à 10 µg/ml et plus particulièrement inférieure à 5 µg/ml.

10 Au sens de la présente invention, un tel dérivé peut également être nommé « conjugué ».

Plus particulièrement, la présente invention concerne, selon un autre de ses aspects, des nanoparticules hydrodispersibles d'au moins un actif thérapeutique de faible solubilité aqueuse dans lesquelles ledit actif y est présent sous une forme associée à au moins un composé hydrocarboné à structure squalénique ou analogue.

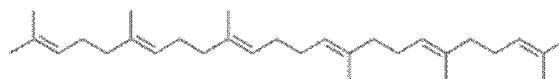
15 Dans le document PCT/FR2005/050488, les inventeurs ont déjà fait état de l'aptitude du squalène, lorsqu'il est couplé de manière covalente à la gemcitabine, une molécule hydrophile et polaire, à former spontanément des nanoparticules d'une centaine de nanomètres en milieu aqueux. Cette capacité y est notamment expliquée par le
20 comportement amphiphile des dérivés ainsi synthétisés, la partie squalène représentant la partie hydrophobe et la partie gemcitabine la partie hydrophile.

Or, contre toute attente, les inventeurs ont constaté que la mise en présence de dérivés d'actifs thérapeutiques de faible solubilité aqueuse voire hydrophobes, résultant du couplage covalent d'au moins une molécule dudit actif thérapeutique avec au moins
25 une molécule d'un composé hydrocarboné à squelette squalénique, avec un solvant polaire à l'image de l'eau par exemple, conduit également à la formation spontanée de particules de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres, donc avantageusement compatibles avec une administration par voie systémique et demeurant dotées de l'efficacité thérapeutique de l'actif considéré.

30 La formulation de ces actifs thérapeutiques hydrophobes à l'état de nanoparticules conformes à la présente invention constitue donc une alternative avantageuse au regard des formulations déjà existantes.

Dérivé hydrocarboné à structure squalénique

Au sens de la présente invention, une « structure squalénique » entend désigner une structure hydrocarbonée, linéaire, formée d'unités isoprène, et plus particulièrement au nombre de 6, à l'image du squalène dont la formule est la suivante :



5

A titre illustratif de ces composés hydrocarbonés, on peut plus particulièrement citer l'acide squalénique et ses dérivés.

Comme les inventeurs l'ont constaté, cette structure squalénique est particulièrement importante dans le cadre de la présente invention car elle manifeste spontanément, lorsqu'elle est mise en présence d'un milieu polaire et plus particulièrement l'eau, une conformation compactée.

De manière inattendue, les inventeurs ont constaté que cette aptitude demeure lorsqu'un tel dérivé est associé et notamment lié de manière covalente à une autre entité chimique également de caractère hydrophobe. Il s'en suit la génération d'une architecture compactée à l'état de nanoparticules dans laquelle les deux entités chimiques sont intimement imbriquées l'une dans l'autre.

Au sens de la présente invention, analogue désigne un composé hydrocarboné d'une part, apte à reproduire le comportement d'un dérivé du squalène lorsqu'il est mis en présence d'un milieu polaire et d'autre part, capable de reproduire cette aptitude lorsqu'il est lié à une molécule d'un actif thérapeutique de faible solubilité aqueuse. Sont notamment couverts sous cette définition les formes substituées des dérivés du squalène et en particulier l'acide squalénique et ses dérivés, notamment de substitution.

Un tel dérivé peut être par exemple à l'image de l'acide 1, 1', 2-tris-norsqualénique, l'acide squalénoyl-acétique, la 1, 1', 2-tris-norsqualénamine, le 1, 1', 2-tris-norsqualénol, le 1, 1', 2-tris-norsqualénethiol, l'acide squalénacétique, le squalényléthanol, le squalényléthanethiol ou encore la squalényléthylamine

Généralement au moins une molécule hydrocarbonée à structure squalénique est liée de manière covalente à une molécule d'un actif thérapeutique de faible solubilité aqueuse. Bien entendu, le nombre de molécules de dérivé hydrocarboné susceptible d'interagir avec une molécule d'actif thérapeutique peut être supérieur à 1. Un dérivé

30

selon l'invention peut comprendre au moins deux radicaux à structure squalénique, identiques ou différents.

Ce composé hydrocarboné est généralement porteur d'une fonction susceptible de réagir avec une fonction présente sur la molécule de l'actif considérée de manière à établir un lien covalent entre les deux entités par exemple de type ester, éther, thioéther, disulfure, phosphate ou amide. Avantageusement, il s'agit d'une fonction carboxylique. Auquel cas, le dérivé hydrocarboné à structure squalénique est l'acide squalénique ou l'un de ses dérivés tels que par exemple l'ester de squalénoyl N-hydroxysuccinimidyle.

Selon une variante de réalisation, le lien covalent existant entre les deux types de molécules peut être figuré par un « linker » ou encore bras de liaison. Un tel bras peut notamment s'avérer utile lorsque les fonctions respectivement présentes sur le composé à structure squalénique et l'actif thérapeutique de faible solubilité n'ont pas d'affinité réactionnelle l'une vis-à-vis de l'autre et donc ne sont pas susceptibles de former le lien covalent attendu. Un tel bras permet précisément d'introduire *via* chacune des deux extrémités de son squelette les fonctions adéquates, i.e. possédant respectivement l'affinité réactionnelle attendue, l'une pour la fonction présente sur le dérivé à structure squalénique et l'autre pour la fonction présente sur l'actif considéré.

On peut également envisager que ce bras de liaison possède en outre au niveau de son squelette une fonction labile, propice ultérieurement à la séparation du composé à structure squalénique de l'actif thérapeutique. Il peut par exemple s'agir d'un motif peptidique reconnaissable par une enzyme.

Les motifs de type bras de liaison sont bien connus de l'homme de l'art et leur mise en œuvre relève clairement de ses compétences.

A titre représentatif des bras de liaison envisageables selon l'invention, on peut notamment citer les motifs (poly)aminoacides, polyols, saccharidiques, et polyéthylèneglycol (polyétheroxides) de faible poids moléculaire, en particulier polyols, saccharidiques et polyéthylèneglycol (polyétheroxides) de faible poids moléculaire.

Ainsi, au sens de la présente invention, un « lien covalent » figure de préférence une liaison covalente notamment telle que précisée ci-dessus, mais couvre également un lien covalent figuré par un bras de liaison tel que défini précédemment.

Actifs thérapeutiques de faible solubilité

Au sens de la présente invention, un actif thérapeutique de faible solubilité aqueuse est un composé possédant une solubilité inférieure à 100 µg/ml dans de l'eau pure, mesurée à température ambiante c'est-à-dire 25 °C environ, notamment inférieure à 25 µg/ml, en particulier inférieure à 20 µg/ml, notamment inférieure à 15 µg/ml voire inférieure à 10 µg/ml et plus particulièrement inférieure à 5 µg/ml. Au sens de l'invention, une eau pure est une eau de pH proche de la neutralité (entre pH5 et pH8) et dénuée de tout autre composé tel que des sels organiques ou inorganiques par exemple.

Au sens de la présente invention, les actifs thérapeutiques plus particulièrement considérés peuvent être choisis parmi les substances des groupes 2 et 4 de la classification biopharmaceutique.

A titre représentatif de ces substances de faible solubilité aqueuse, peuvent être notamment cités les immunosuppresseurs, les agents chimiothérapeutiques, notamment antitumoraux, comme les taxoïdes, la doxorubicine encore appelée adriamycine et son isomère l'épirubicine, les agents antiangiogéniques, des antiviraux, antibactériens, antibiotiques et antiparasitaires, les substances agissant sur le métabolisme des sucres, les peptides, les lipides, les agents agissant sur les canaux calciques, les antiflogistiques non stéroïdiens et les composés peptidiques comme l'insuline.

Il est entendu que dans le cadre de la présente invention ce sont uniquement les formes hydrophobes ou de très faible solubilité des actifs précités qui sont considérées. Leurs formes ioniques ou autres, susceptibles d'être solubles en milieu aqueux ne présentant pas d'intérêt dans le cadre de l'invention dans la mesure où il ne s'avère pas nécessaire de suppléer à leur égard, à un défaut de solubilité aqueuse.

Ainsi, dans le cas de la présente invention, la forme de l'actif couplée à au moins une molécule à structure squalénique est généralement une forme neutre, c'est-à-dire non ionique ou non salifiée sauf si celle-ci s'avère elle-même de faible hydrosolubilité.

Les immunosuppresseurs sont des composés hydrophobes et comprennent les undécapeptides cycliques N-méthylés. Parmi cette famille d'actifs, les cyclosporines sont plus particulièrement considérées. Il s'agit notamment des cyclosporines A et G. Toutefois, d'autres macrolides peuvent également être considérés selon l'invention.

Il peut également s'agir d'un immunosuppresseur tel que le déoxyspergualine, le rapamycine ou l'ascomycine.

Selon une variante préférée de l'invention, les actifs thérapeutiques de faible solubilité sont plus particulièrement les taxanes et taxoïdes.

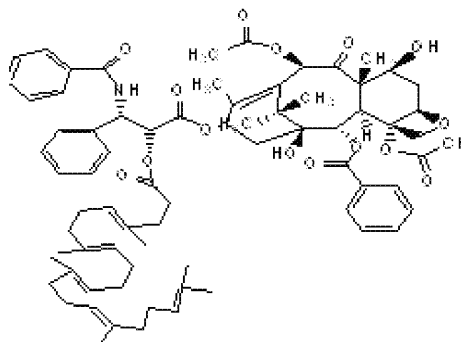
5 De tels composés sont notamment décrits dans la demande WO 2005/013968. Il s'agit plus préférablement du docétaxel, paclitaxel ou un de leurs dérivés.

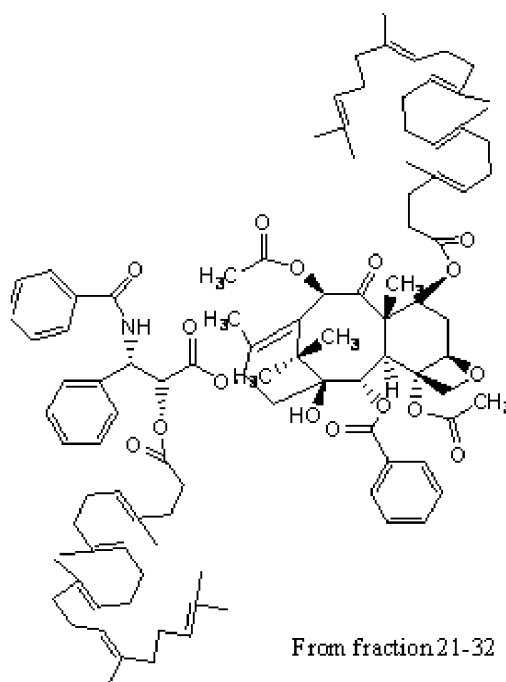
Comme précisé précédemment, ces substances sont fonctionnalisées avec au moins une molécule d'un composé hydrocarboné à structure squalénique ou analogue. Ainsi, les actifs thérapeutiques considérés selon la présente invention peuvent
10 comprendre deux dérivatisations, trois dérivatisations, voire plus, celles-ci pouvant être identiques ou différentes.

La réaction nécessaire à l'établissement d'au moins une liaison covalente entre une molécule d'un actif thérapeutique de faible solubilité aqueuse et au moins une molécule d'un dérivé hydrocarboné de structure squalénique ou analogue peut être
15 effectuée selon des conditions standard et sa réalisation relève donc clairement des connaissances de l'homme de l'art.

Cette réaction est généralement réalisée en solution en présence et en excès d'au moins un composé à structure squalénique par rapport à l'actif faiblement hydrosoluble considéré, par exemple à raison de deux équivalents, selon les conditions
20 standard requises pour faire interagir les deux fonctions spécifiques portées par chacune des molécules.

A titre illustratif et non limitatif des dérivés hydrodispersibles conformes à la présente invention, peuvent tout particulièrement être cités les dérivés taxoïdes suivants ;



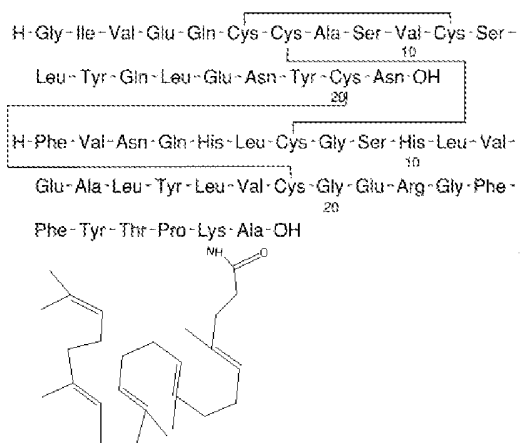


Il s'agit de deux composés dérivant de la fonctionnalisation d'une molécule de paclitaxel avec respectivement une et deux molécules d'acide squalénique.

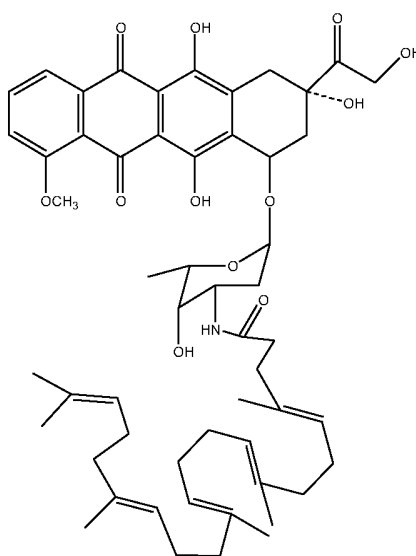
D'autres dérivés hydrodispersibles conformes à l'invention sont :

5

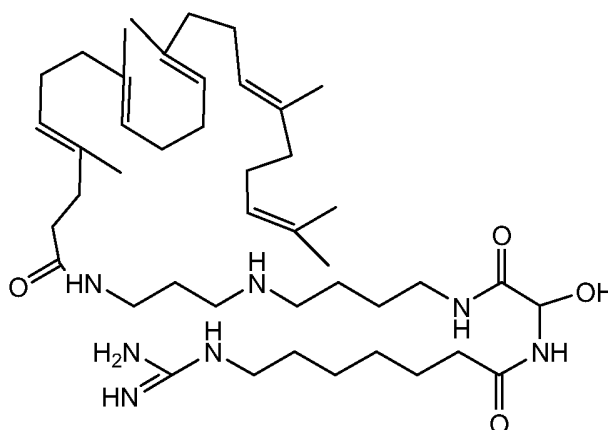
- le squalénoyl-insuline de formule comme suit :



- le squalénoyl-épirubicine de formule comme suit :



- et le squalénoyl-déoxyspergualine de formule comme suit :



5 Ces composés sont généralement obtenus sous la forme d'une dispersion aqueuse.

Ainsi, selon un autre de ses aspects, la présente invention concerne une dispersion aqueuse d'au moins un dérivé tel que défini précédemment.

10 Nanoparticules selon l'invention

Comme précisé précédemment, le couplage covalent d'un actif thérapeutique avec au moins une molécule d'un composé hydrocarboné à structure squalénique est de nature à conférer à l'actif ainsi fonctionnalisé avec au moins un radical squalénoyle une aptitude à s'organiser sous une forme compactée dans un milieu solvant polaire, conduisant ainsi à la formation de nanoparticules.

15

D'une manière générale, les nanoparticules ainsi obtenues possèdent une taille moyenne variant de 30 à 650 nm, en particulier de 30 à 500 nm, et en particulier de 50 à 250 nm, voire de 100 à 200 nm mesurée par diffusion de la lumière à l'aide du nanosizer Coulter[®] N4MD, Coulter Electronics, Hialeah, USA.

5 Ainsi, l'interaction d'un actif thérapeutique faiblement hydrosoluble comme considéré selon l'invention avec un dérivé hydrocarboné conforme à l'invention, et plus particulièrement avec l'acide squalénique ou l'un de ses dérivés comme par exemple, l'ester de squalénoyl N-hydroxysuccinimidyle, confère à ladite substance thérapeutique des caractéristiques physico-chimiques suffisantes pour lui conférer une aptitude à former
10 des particules dont la taille s'avère compatible pour une administration parentérale et notamment par voie intraveineuse.

La présente invention concerne selon un autre de ses aspects, un procédé de préparation de ces nanoparticules, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la solubilisation d'un dérivé selon l'invention c'est-à-dire formé
15 préliminairement par couplage d'au moins une molécule d'un composé hydrocarboné à structure squalénique ou analogue à une molécule d'un actif thérapeutique de faible solubilité aqueuse, dans au moins un solvant organique, par exemple un alcool comme l'éthanol, à une concentration suffisante pour obtenir, lors de l'ajout du mélange résultant, sous agitation, et généralement au goutte-à-goutte, à une phase aqueuse, la formation
20 instantanée de nanoparticules dudit dérivé en suspension dans ladite phase aqueuse, et,
 - le cas échéant, l'isolement desdites nanoparticules.

La réaction peut généralement être réalisée à température ambiante. Quelle qu'elle soit, la température de réaction ne doit pas affecter l'activité de l'actif considéré. Le procédé de préparation des nanoparticules selon l'invention est particulièrement
25 avantageux dans la mesure où il ne requiert pas la présence de tensioactifs.

Comme précisé précédemment, le couplage entre le dérivé hydrocarboné à structure squalénique et la molécule d'actif peut être direct ou *via* un bras de liaison.

Les inventeurs ont en outre constaté qu'il était possible de contrôler la taille de ces particules à travers la quantité de l'actif thérapeutique mis en œuvre pour la
30 nanoprécipitation. En effet, l'augmentation de la concentration en produit de couplage entraîne généralement une augmentation de la taille, et inversement.

Selon un mode de réalisation avantageux, les nanoparticules selon l'invention sont formulées à l'état de dispersion aqueuse en vue de leur administration généralement par voie systémique.

5 Selon un mode de réalisation avantageux, cette dispersion aqueuse contient moins de 5 % en poids, voire moins de 2 % en poids en alcool en C₂ à C₄ tel que par exemple l'éthanol.

10 Selon un autre mode de réalisation avantageux, cette dispersion aqueuse contient moins de 5 % en poids, voire moins de 2 % en poids et plus particulièrement est dénuée de tensioactif ou analogue tels que par exemple les polyéthylène glycols, le polyglycérol et leurs dérivés, tels les esters par exemple.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, cette dispersion aqueuse contient moins de 5 % en poids, voire moins de 2 % en poids et plus particulièrement est dénuée d'huile de ricin polyoxyéthylée telle que par exemple celle commercialisée sous la dénomination Crémophore EL[®].

15 Selon un autre mode de réalisation avantageux, cette dispersion aqueuse possède intrinsèquement une viscosité compatible avec une administration par voie intraveineuse.

20 Ainsi, la formulation en milieu aqueux du taxoïde tel que le Paclitaxel[®] à l'aide de l'acide squalénique à l'état de nanoparticules hydrodispersibles permet, avantageusement, d'obtenir une suspension de nanoparticules sans autre additif que le dextrose 5 % nécessaire pour obtenir l'isotonie de la suspension injectable. Il s'avère ainsi possible de : (i) s'affranchir de l'utilisation du Crémophore toxique, (ii) disposer d'une formulation aqueuse directement injectable et (iii) administrer des concentrations plus importantes du produit (jusqu'à 4 mg/ml).

25

La présente invention concerne également selon un autre de ses aspects, l'utilisation de ces dérivés et nanoparticules dans des compositions pharmaceutiques.

30 Elle concerne en outre une composition pharmaceutique comprenant, à titre de matière active, au moins un dérivé conforme à la présente invention, notamment sous la forme de nanoparticules.

Les dérivés conformes à la présente invention peuvent également être administrés par toutes les voies conventionnelles. Toutefois, comme précisé

précédemment, compte tenu de la faible taille de leurs particules, ils sont administrables sous la forme d'une suspension aqueuse par voie intraveineuse et donc compatibles avec la microcirculation vasculaire.

Un autre aspect de l'invention concerne donc une composition pharmaceutique comprenant au moins, au titre de matière active, un composé conforme à la présente invention notamment sous la forme de nanoparticules. Les dérivés conformes à la présente invention peuvent y être associés avec au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

A titre d'exemples de formulations pharmaceutiques compatibles avec les compositions selon l'invention, on peut notamment citer :

- les injections ou perfusions intraveineuses ;
- les solutions salines ou d'eau purifiée ;
- les compositions pour inhalation ;
- les capsules, dragées et cachets incorporant notamment à titre de véhicule, de l'eau, du phosphate de calcium, des sucres, tels que lactose, dactrose ou mannitol, du talc, de l'acide stéarique, de l'amidon, du bicarbonate de sodium et/ou de la gélatine.

Lorsque les composés sont utilisés en dispersion dans une solution aqueuse, ils peuvent être associés à des excipients de type agent séquestrant ou chélatant, anti-oxydant, agents modifiant le pH et/ou agents tampons.

Les nanoparticules selon l'invention sont bien entendu susceptibles de porter en surface une multitude de fonctions réactives, à l'image des fonctions hydroxyle ou amine par exemple. Il est donc envisageable de fixer à ces fonctions toutes sortes de molécules, notamment par des liaisons covalentes.

A titre illustratif et non limitatif de ce type de molécules susceptibles d'être associées aux nanoparticules, on peut notamment citer les molécules de type marqueur, les composés susceptibles d'assurer une fonction de ciblage, ainsi que tout composé apte à leur conférer des caractéristiques pharmacocinétiques particulières. En ce qui concerne ce dernier aspect, on peut ainsi envisager de fixer en surface de ces nanoparticules des dérivés lipophiles du polyéthylène glycol, comme par exemple le polyéthylène glycol cholestérol ou le polyéthylène glycol-phosphatidyléthanolamine, ou mieux encore le polyéthylène glycol squalène. Un enrobage de surface à base d'un tel composé est en

effet avantageux pour conférer une rémanence vasculaire accrue en raison d'une réduction significative de la capture des nanoparticules par les macrophages hépatiques.

Outre les composés précités, les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent contenir des agents de type conservateurs, des agents mouillants, des agents solubilisants et des agents de coloration.

Pour des raisons évidentes, les quantités en dérivés selon l'invention susceptibles d'être mis en œuvre sont susceptibles de varier significativement selon le mode d'utilisation et la voie retenue pour leur administration.

Par exemple, pour un traitement par voie systémique en taxoïde, destiné à un patient de type adulte, on peut envisager d'administrer un dérivé conforme à la présente invention à une dose d'environ 0,1 à 150 mg/kg de poids corporel et par jour et plus particulièrement de 1 à 40 mg/kg par jour.

En revanche, pour une administration topique on peut envisager de formuler au moins un dérivé conforme à la présente invention à raison de 0,1 à 40 % en poids, voire plus, par rapport au poids total de la formulation pharmaceutique considérée.

Il est également possible de co-administrer au moins un dérivé conforme à la présente invention avec au moins une autre matière active susceptible d'être également bénéfique à l'égard de la pathologie considérée.

A titre représentatif de ces matières actives susceptibles d'être combinées aux dérivés conformes à la présente invention, on peut notamment citer d'autres molécules ou macromolécules anticancéreuses ou cytostatiques (par exemple sels de platine, antracyclines, poisons du fuseau mitotique, inhibiteurs de topoisomérases, de kinases ou de métalloprotéases), des agents anti-inflammatoires de type corticoïde (par exemple dexaméthasone) ou non corticoïde ou encore des molécules à activité immunoadjuvante (par exemple anticorps à activité anticancéreuse). L'association avec l'hyperthermie utilisée dans certaines chimiothérapies peut être envisagée. Les dérivés conformes à la présente invention peuvent également être combinés aux thérapies chirurgicales et/ou aux radiations pour le traitement du cancer.

La présente invention concerne également, selon un autre de ses aspects, une méthode de traitement thérapeutique comprenant l'administration à un patient d'une quantité efficace d'au moins un dérivé et/ou des nanoparticules selon l'invention,

éventuellement en association avec une autre matière active et/ou moyens thérapeutiques (hyperthermie, radiations) et/ou thérapies chirurgicales, tels que définis ci-dessus

Les exemples et figures, figurant ci-après, sont présentés à titre illustratif et non limitatif du domaine de l'invention.

5

Figure 1 : Accumulation de la tubuline après incubation des cellules KB avec les nanoparticules de squalénoylpaclitaxel (1B) au regard des cellules KB non traitées (1A).

Figure 2 : Evaluation de l'activité anti-cancer *in vivo* des nanoparticules d'un dérivé de squalénoyldiglycolyl-paclitaxel obtenu selon l'Exemple 11, par caractérisation du volume d'une tumeur implantée sur une souris (en mm³) en fonction du temps (nombre de jours après implantation de la tumeur).

Figure 3 : Evaluation des variations du poids de souris porteuses de leucémie L1210, traitées ou non avec les nanoparticules de squalénoyl-doxorubicine, induites par les métastases, en fonction du temps (nombre de jours après injection intra-veineuse de cellules leucémique L1210).

Figure 4 : Evaluation du taux de survie des souris porteuses de leucémie L1210, traitées ou non avec les nanoparticules de squalénoyl-doxorubicine, en fonction du temps (nombre de jours après injection intra-veineuse de cellules leucémique L1210).

20

Exemple 1

Synthèse du monosqualénoylpaclitaxel

450 mg de Paclitaxel (0,526 mmol) dans du dichlorométhane (DCM) sont mis à réagir avec du 1-ethyl-3-(3-diméthylamino-propyl carbodiimide (EDCA, 2,5 équivalents molaires par rapport au Paclitaxel), du diméthylamino pyridine (DMAP, 0,5 équivalent molaire par rapport au Paclitaxel) et de l'acide squalénique (2 équivalents molaires par rapport au Paclitaxel) préalablement dissous dans du DCM à température ambiante. Après 1 h, la réaction est terminée et stoppée à l'aide d'eau à pH 5 et l'extraction est réalisée avec une solution aqueuse de chlorure de sodium (NaCl). La phase aqueuse est ensuite lavée avec le DCM. La purification du mélange obtenu se fait par chromatographie Flash SiO₂ (2,5 x 40 cm) éluée avec un mélange de DCM/acétate d'éthyle. Les fractions 62-80 sont récoltées et le monosqualénoylpaclitaxel ainsi obtenu

30

est caractérisé par RMN ^1H (Bruker 300 Mhz), spectroscopie de masse (Micromass Waters ESI) et RP-HPLC.

Formule chimique : $\text{C}_{74}\text{H}_{93}\text{NO}_{15}$; PM : 1236,53

5

Exemple 2

Synthèse du disqualénoylpaclitaxel

450 mg de Paclitaxel (0,526 mmol) dans du dichlorométhane (DCM) sont mis à réagir avec du 1-éthyl-3-(3-diméthylamino-propyl)-carbodiimide (EDCA, 2,5 équivalents molaires par rapport au Paclitaxel), du diméthylamino pyridine (DMAP, 0,5 équivalent molaire par rapport au Paclitaxel) et de l'acide squalénique (2 équivalents molaires par rapport au Paclitaxel) préalablement dissous dans du DCM à température ambiante. Après 1 h, la réaction est terminée et stoppée à l'aide d'eau à pH 5 et l'extraction est réalisée avec une solution aqueuse de chlorure de sodium (NaCl). La phase aqueuse est ensuite lavée avec le DCM. La purification du mélange obtenu se fait par chromatographie Flash SiO_2 (2.5 x 40 cm) éluee avec un mélange de DCM/acétate d'éthyle. Les fractions 21-32 sont récoltées et le disqualénoylpaclitaxel ainsi obtenu est caractérisé par RMN ^1H (Bruker 300 Mhz), spectroscopie de masse (Micromass Waters ESI) et RP-HPLC.

20

Formule chimique : $\text{C}_{101}\text{H}_{135}\text{NO}_{16}$; PM : 1619,15

Exemple 3

Préparation des nanoparticules de squalénoylpaclitaxel

4 mg de squalénoylpaclitaxel sont dissous dans 1,5 ml d'éthanol (2,5 mg/ml) et ajoutés goutte à goutte et sous agitation continue (vitesse 500 tpm) à 1 ml d'une solution aqueuse contenant 5 % de dextrose. Le squalénoylpaclitaxel s'auto-assemble sous forme de nanoparticules d'une taille comprise entre 100 et 200 nm. L'éthanol est ensuite complètement évaporé sous pression réduite à l'aide d'un rotavapor[®] pour obtenir une suspension nanoparticulaire de squalénoylpaclitaxel à la concentration finale de 4 mg/ml.

30

Exemple 4**Préparation d'autres nanoparticules de squalénoylpaclitaxel**

Des quantités variables (précisées en tableau 1 ci-après) de squalénoylpaclitaxel sont dissoutes dans 0,25 ml de tétrahydrofurane (THF). Les solutions obtenues sont ajoutées goutte à goutte et sous agitation continue (vitesse 500 tpm) à 0,25 ml d'eau. Le squalénoylpaclitaxel précipite sous forme de nanoparticules d'une taille comprise entre 100 et 200 nm. Le THF est ensuite complètement évaporé sous pression réduite à l'aide d'un rotavapor[®] pour obtenir des suspensions nanoparticulaires de squalénoylpaclitaxel dont la taille varie en fonction de la concentration (voir tableau ci-dessous)

Tableau 1

Squalénoyl paclitaxel (mmol)	Diamètre (nm)	Index de Polydispersité
0,36	151 ± 84	0,39
0,88	169 ± 92	0,30
1,76	177 ± 99	0,31

Exemple 5**Injection des nanoparticules de squalénoylpaclitaxel aux souris et comparaison avec le TAXOL**

La suspension nanoparticulaire de squalénoylpaclitaxel telle que préparée à l'exemple 3 (4 mg/ml) est directement injectée par voie intraveineuse à des souris (C57BL6) à la dose de 4 x 50 mg/kg (équivalent Paclitaxel) ; les injections ont lieu aux jours 0, 5, 9 et 14. L'injection est aisée et les animaux ne présentent aucun signe de toxicité. Aucune mortalité n'est enregistrée (dans un délai d'au moins un mois). L'injection intraveineuse directe de la solution de TAXOL (sans dilution dans du NaCl 0,9 %) conduit à la mort immédiate de 100 % des souris traitées. Lorsque la solution de TAXOL est préalablement diluée dans du NaCl 0,9 %, la dose maximale qui peut-être injectée est de 20 mg/kg.

Exemple 6

Activité anticancéreuse des nanoparticules de squalénoylpaclitaxel

La caractérisation de cette activité est réalisée par immunofluorescence selon le protocole suivant :

Jour 1 : les cellules KB 3,1 provenant d'un carcinome cervical humain, et les
5 cellules HT-29 correspondant à une lignée humaine de cellules cancéreuses du colon, sont déposées sur des plaques à 6 puits à une densité de 20000 cellules/puits (volume final 2 ml RPMI plus FCS). Les cellules sont incubées à une température de 37 °C et à 5 % de CO₂.

Jour 2 : Les cellules sont rincées et on y ajoute les nanoparticules de
10 squalénoyl paclitaxel (concentration 5 µM) tel que préparées selon le protocole décrit dans l'exemple 3.

Jour 3 : Après 14-16 h, on rince deux fois avec du PBS puis on ajoute la solution d'extraction (Triton X-100 plus 0,5 % PEM - PIPES 100 mM, EGTA 2 mM , MgCl₂ 2 mM pH 6.8). Après 4 min, on rince puis on ajoute 2 ml d'une solution à 3 % de
15 formaldéhyde dans le PEM. 40 min plus tard, on rince puis on ajoute 20 % de FCS dans le PBS pendant 30 min. On rajoute ensuite l'anticorps monoclonal murin anti-α-tubulin-FITC (dilué à 1:200) et on laisse incubé pendant 1 h. On rince enfin avec du PBS et on procède à une analyse par microscopie confocale de la fluorescence (Leica TCS SP2).

Comme illustrée par la figure 1B, la formation d'amas de tubuline est
20 clairement visible en microscopie à fluorescence, ce qui montre l'activité de poison du fuseau des nanoparticules de squalénoylpaclitaxel. Les cellules KB non traitées sont présentées à titre de contrôle (figure 1A).

Exemple 7

25 Préparation de nanoparticules de squalénoyl-insuline

a) Obtention du squalénoyl N-hydroxysuccinimidyle

La réaction avec l'insuline requiert au préalable la préparation et l'isolation de l'ester de squalénoyl N-hydroxysuccinimidyle, un intermédiaire réactif. Pratiquement, 300 mg (0,75 mmol) d'acide squalénique dissous dans 2 ml de dichlorométhane (DCM) sont mis
30 à réagir avec 72,5 mg de N-hydroxysuccinimide (2,0 excès molaire) et 309 mg dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) (2x) dissous dans du dichlorométhane et maintenus sous agitation pendant 2 h. On enlève ensuite l'urée précipitée, puis on dissout le

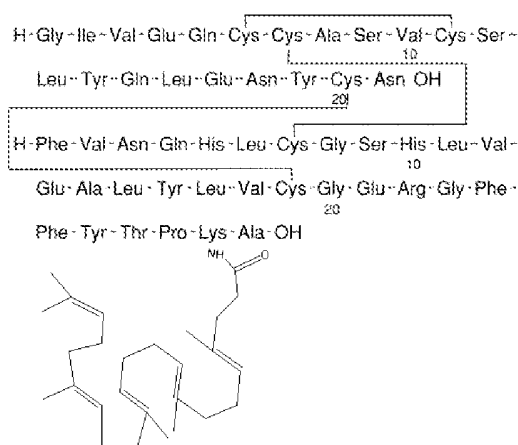
mélange dans de l'acétate d'éthyle, on le filtre et on le conserve à une température de -20 °C. Les esters de squalénoyl N-hydroxysuccinimidyle (Sq-CO-NHS) sont caractérisés par RMN et par spectrométrie de masse.

b) Obtention du conjugué de squalénoyl-insuline

- 5 50 mg d'insuline (origine pancréas bovin et répondant aux critères des tests USP) sont dissous dans 5 ml de diméthylsulfoxyde sec (> 99 % de pureté) et ajoutés à 30 µl de N,N-diisopropyléthylamine dans un flacon contenant 13,2 mg de Sq-CO-NHS (dans un excès molaire de 3:1). La réaction est effectuée à température ambiante pendant 2 h et la solution est intensivement dialysée afin d'enlever les solvants organiques et les petites
- 10 impuretés moléculaires, puis lyophilisée. Le solide est ensuite lavé avec du DCM puis filtré. On obtient 46 mg de poudre blanche.

La réaction de conjugaison est contrôlée par HPLC analytique en utilisant une colonne Waters RP C18 (150,9 mm, 5 µm, 300 Å) et du méthanol/eau (gradient plus 0,1 % TFA) comme solvant d'élution

- 15 La caractérisation du conjugué squaléné de l'insuline a été réalisée par des analyses MALDI-TOF et Orbi-Trap MS. Le composé répond à la formule développée suivante :



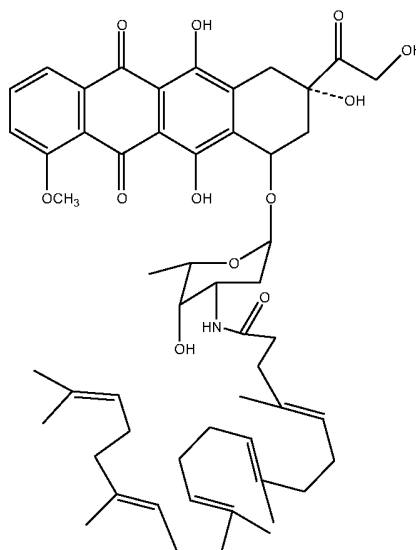
- 20 c) Préparation des nanoparticules de squalénoyl-insuline.

4 mg du conjugué squalène de l'insuline purifié sont dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) sec (1 ml) et dialysés de manière intensive avec de l'eau distillée. Les nanoparticules se forment durant le processus de dialyse. Le volume final est réduit à 1 ml par concentration solide polyéthylène glycol (PEG) 10 kDa.

Exemple 8**Préparation de nanoparticules de squalénoyl-épirubicine**

a) Obtention du dérivé 3' amido squalénoyl-épirubicine

- 5 On dissout rapidement 100 mg d'épirubicine dans 2 ml de diméthylformamide (DMF) sec que l'on mélange à une solution de 180 mg d'ester de squalénoyl N-hydroxysuccinimide (excès molaire : 2,0) préalablement dissous dans du DMF sec et on ajoute 20 μ l de N,N-diisopropyléthylamine. Après mélange pendant 2 h à une température de 25 °C, on dilue la solution avec du DCM et on lave avec de l'eau distillée.
- 10 On réalise la purification à l'aide d'une chromatographie flash sur SiO₂ (2,5 x 25 cm) éluée avec un mélange DCM-éthanol. Les fractions 60-67 sont récoltées et 100 mg du conjugué 3'amido squalénoyl-épirubicine sont obtenus et caractérisés par RMN et spectrométrie de masse. Le composé répond à la formule développée suivante :



15

b) Préparation de nanoparticules de squalénoyl-épirubicine

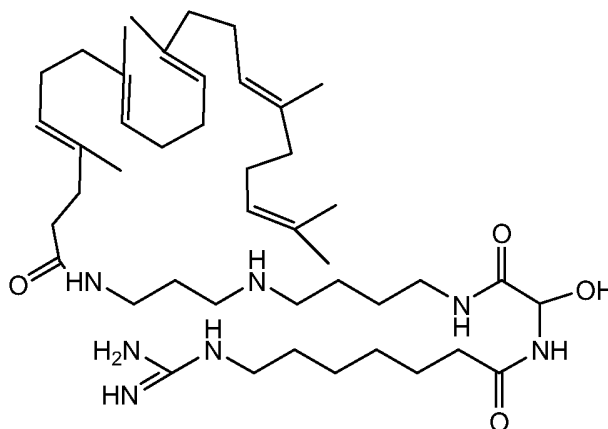
- Un volume de 200 μ l de squalenoyl-3-épirubicine dissous dans l'acétone (10 mg/ml) est ajouté au goutte-à-goutte à 5 ml d'eau distillée, sous forte agitation. Une fine suspension rouge est immédiatement obtenue. Après évaporation de l'acétone sous pression réduite à l'aide d'un rotavapor[®], on obtient une suspension nanoparticulaire stable.
- 20

Exemple 9

Préparation de nanoparticules de squalénoyl-déoxyspergualine

a) Obtention de la squalénoyl-déoxyspergualine

On prépare d'abord la déoxyspergualine par purification du produit commercial
5 dénommé Gusperimus (Spanidine). Après deux processus chromatographiques (échange
ionique et filtration sur gel), on met en réaction la forme basique de la déoxyspergualine
(faiblement soluble dans l'eau) avec l'ester de squalénoyl N-hydroxysuccinimide. Pour
ce faire, on dissout rapidement 24 mg de déoxyspergualine dans 1 ml de DMF sec que
l'on ajoute à 29 mg d'ester de squalénoyl N-hydroxysuccinimide (excès molaire : 1,3)
10 préalablement dissous dans le même solvant. On ajoute ensuite 10 µl de N,N-
diisopropylethylamine. Après mélange pendant 2 h à une température de 25 °C, on dilue
la solution avec du DCM et on lave avec de l'eau distillée. On réalise la purification *via*
une chromatographie flash sur SiO₂ (1,5 x 28 cm) éluée avec du DCM/éthanol plus 1 %
de triéthylamine (TEA). On récolte ensuite les fractions qui se sont révélées positives au
15 test de Sakaguchi (groupe guanidine). 15 mg du conjugué de squalénoyl-
déoxyspergualine sont obtenus puis caractérisés par RMN et spectrométrie de masse. Le
conjugué de squalénoyl-déoxyspergualine a la formule développée suivante :



20 b) Préparation des nanoparticules de squalénoyl-déoxyspergualine

100 µl de squalénoyl-déoxyspergualine dissous dans de l'éthanol (4 mg/ml) sont ajoutés
au goutte-à-goutte à 2 ml d'eau distillée sous forte agitation. Après évaporation de
l'éthanol sous pression réduite à l'aide d'un rotavapor[®], on obtient une suspension de
nanoparticules d'une taille de 162 nm (indice de polydispersité 0,12 caractérisé par un
25 potentiel de surface de 27,38 +/- 2,60 mV).

Exemple 10**Synthèse du squalénoylsuccinyl-paclitaxel****Etape 1**

5 Le paclitaxel est dissous dans de la 4-diméthylaminopyridine (0,1 eq.) et de l'anhydride succinique (2 eq.) et séché sous vide durant 2 heures. Après ajout de pyridine sèche, le mélange réactif est agité pendant 3 heures à température ambiante. Après élimination du solvant, le mélange brut est dissous dans du dichlorométhane (DCM) et rincé avec de la saumure. Aucune étape de purification supplémentaire du paclitaxel-2'-succinate n'est nécessaire. L'analyse RMN pour détecter l'absence de 2' OH, la conversion de 2' C-H (à 5,51) et la présence quantitative de 7 C-H en position normale (4,48) montre la transformation totale du matériau de départ en dérivé succinate.

10

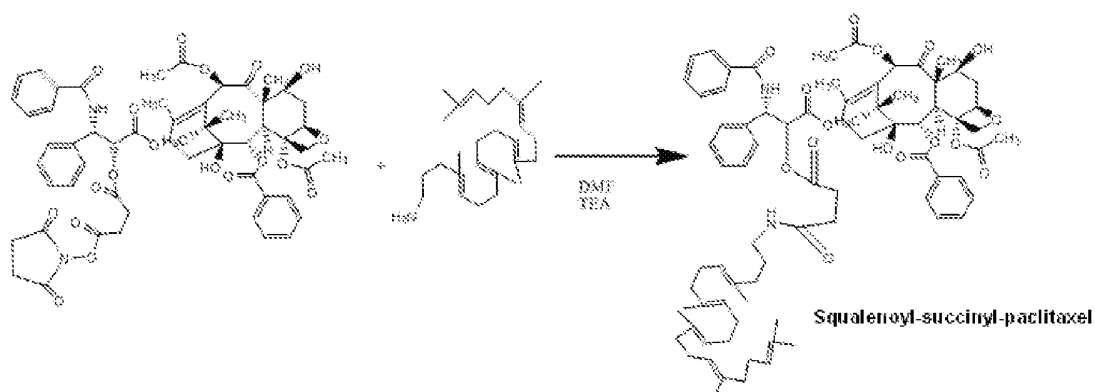
Etape 2

15 Le N-hydroxysuccinimido-diphényle phosphate (SDPP) est préparé à partir de chlorure de diphénylphosphoryle, de N-hydroxysuccinimide, et de triéthylamine (TEA) dans du DCM. Le SDPP brut est trituré dans de l'éther, dissous dans de l'acétate d'éthyle, rincé à l'eau, séché et concentré sous vide afin d'obtenir du SDPP. La caractérisation par spectrométrie de masse (MS) confirme un pic moléculaire à 348.

20

A une solution de paclitaxel-2'-succinate est ajouté du SDPP (1,5 eq.) dans de l'acétonitrile avec de la TEA (4 eq.). Le mélange réactionnel est agité pendant 6 heures à température ambiante, puis concentré sous vide. La réaction brute est dissoute dans de l'acétate d'éthyle et extraite à l'aide de saumure. La formation de paclitaxel-2'-succinyl-NHS est contrôlé par analyses TLC et HPLC, comme décrites ci-dessus, ce qui ne nécessite pas d'étape de purification supplémentaire.

25

Etape 3

Le Paclitaxel-2'-succinyl-NHS dissous dans du diméthylformamide (DMF) sec est mis à réagir avec l'amine squalène (1 eq.) en présence de triéthylamine (1 eq.).

5 Après 8 heures à température ambiante et une nuit à 5 °C, le mélange est extrait à l'aide de saumure et purifié sur un gel de SiO₂, élué avec de l'acétate de DCM-éthyle. Le produit principal (squalénoylsuccinyl-paclitaxel) est élué avec 30-50 % d'acétate d'éthyle et sa pureté est contrôlée par analyse HPLC sur une colonne RP-18.

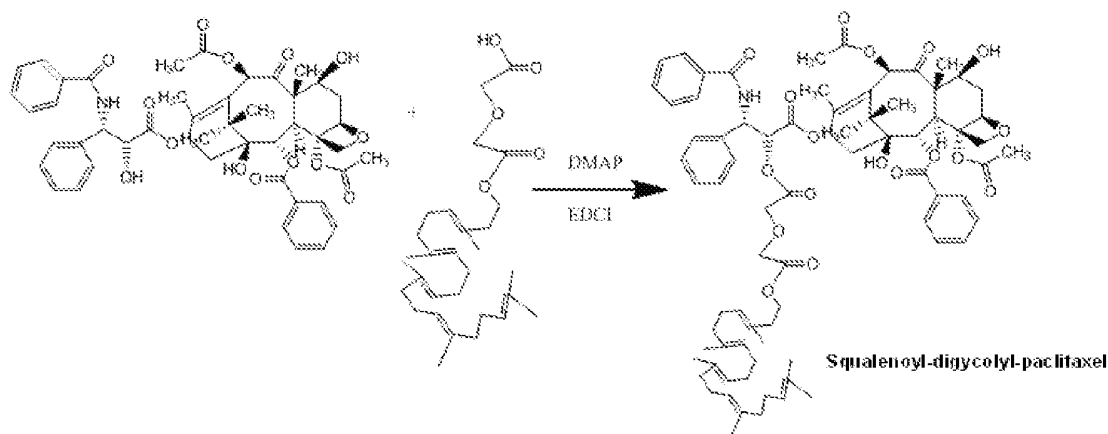
10 ¹H-NMR (CDCl₃): d 8,13 (d, 2H, OC(O) o-ArH), 7,75 (d, 2H, NC(O) o-ArH), 7,62 (t, 1H, OC(O) p-ArH), 7,53±7,49 (bande, 3H), 7,43±7,35 (bande, 7H), 6,91 (t, 1H, NH), 6,35 (s, 1H, C(10)-H), 6,27 (t, 1H, C(13)-H), 5,99 (t, 1H, C(3')-H), 5,69 (d, 1H, C(2)-H), 5,30 (dd, 1H, C(7)-H), 5,44 (dd, 1H, C(2')-H), 5,20 (s, 5H, C(sq)-H), 4,97 (d, 1H, C(5)-H) 4,39±4,25 (bande, 3H), 4,24±4,10 (bande, 7H), 3,96 (d, 1H), 3,85 (dd, 1H),

15 3,75 (m, 1H), 3,42 (t, 2H, sq CH₂-NH), 2,61 (p, 1H, C(6)-H et m 4H succinyle CH₂), 2,46 (d, 3H, C(4)-OAc), 2,41 (m, 1H, C(14)-H), 2,29 et 2,20 (s 4H, CH₂ sq. acide), 2,23(m, 1H, C(14)-H), 2,14 (d, 3H, C(10)-OAc), 2,01 (s, 3H, C(12)-CH₃), 2,00 (m, 16H, CH₂ sq), 1,97 (m, 1H, C(6)-H), 1,81 (s, 3H, C(8)-CH₃), 1,71 (m, 18H, C(sq)-CH₃), 1,41 (d, 3H), 1,21 (s, 3H, C(15)-CH₃), 1,16 (s, 3H, C(15)-CH₃).

Exemple 11**Synthèse du squalénoyldiglycolyl-paclitaxel****Etape 1**

5 Le squalène, sous forme alcoolique, est mélangé avec de l'anhydride diglycolique (2,5 eq) dans de la pyridine sèche à température ambiante pendant toute une nuit, sous agitation. Le solvant est éliminé et le résidu est extrait à partir d'acide chlorhydrique dilué et de la saumure avec du DCM. La conversion du produit attendu est contrôlée par TLC. Le produit ainsi obtenu est séché sous vide et l'acide est utilisé sans

10 étape de purification supplémentaire.

Etape 2

L'acide squalènediglycolique (2 eq.) décrit en étape 1 est dissous dans du DCM, puis le Paclitaxel (1 eq.) et la 4-N,N-diméthylaminopyridine (3 eq.), préalablement dissous dans du DCM, sont ajoutés. Après 10 minutes, l'EDCI (1,3 eq.) est ajouté et la solution est agitée à température ambiante pendant 2 heures. Après élimination du solvant, le produit brut est passé à travers une colonne de gel de silice en utilisant un gradient DCM/éthanol pour obtenir le produit purifié, dont la pureté est contrôlée par

20 analyse HPLC sur une colonne RP-18.

¹H-NMR (CDCl₃): d 8,13 (d, 2H, OC(O) o-ArH), 7,75 (d, 2H, NC(O) o-ArH), 7,62 (t, 1H, OC(O) p-ArH), 7,53±7,49 (bande, 3H), 7,43±7,35 (bande, 7H), 6,91 (t, 1H, NH), 6,35 (s, 1H, C(10)-H), 6,27 (t, 1H, C(13)-H), 5,99 (t, 1H, C(3')-H), 5,69 (d, 1H, C(2)-H), 5,30 (dd, 1H, C(7)-H), 5,44 (dd, 1H, C(2'-H), 5,20 (s, 5H, C(sq)-H), 4,97 (d,

25

1H, C(5)-H) 4,39±4,25 (bande, 3H), 4,33 (m, 4H diglycoyl CH₂), 4,24±4,10 (bande, 7H), 4,12 (m, 2H C(1) squalène), 3,96 (d, 1H), 3,85 (dd, 1H), 3,75 (m, 1H), 2,61 (p, 1H, C(6)-H), 2,46 (d, 3H, C(4)-OAc), 2,41 (m, 1H, C(14)-H), 2,29 and 2,35 (s 4H, CH₂ sq. acide), 2,23 (m, 1H, C(14)-H), 2,14 (d, 3H, C(10)-OAc), 2,01 (s, 3H, C(12)-CH₃), 2,00 (m, 16H, CH₂ sq), 1,97 (m, 1H, C(6)-H), 1,81 (s, 3H, C(8)-CH₃), 1,71 (m, 18H, C(sq)-CH₃), 1,41 (d, 3H), 1,21 (s, 3H, C(15)-CH₃), 1,16 (s, 3H, C(15)-CH₃).

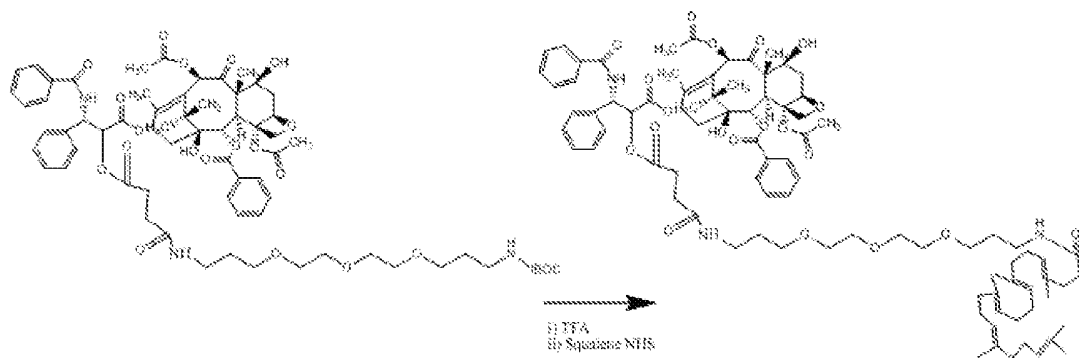
Exemple 12

Synthèse du squalénoylsuccinyl-PEG340-paclitaxel

Etape 1

Le Paclitaxelsuccinyl-NHS (voir Exemple 10, étape 3) est dissous dans du DCM, et la solution de tBoc-NH-PEG3-NH₂ (1 eq.) dans du DCM est ajoutée à la solution précédente sous agitation. La triéthylamine (0,5 eq) est ajoutée à une température de 4 °C, et la réaction est maintenue à une température de 20 °C pendant 5 heures. Le mélange réactif brut est extrait avec 0,1N HCl, puis avec de la saumure. Le produit ainsi obtenu est utilisé à l'étape suivante sans purification supplémentaire.

Etape 2



Squalenoyl-succinyl-PEG 340-paclitaxel

Le Paclitaxel-succinyl-Peg3-NH-tBoc est dissous dans du DCM sec, et de l'acide trifluoroacétique (TFA) est ajouté sous agitation à 20 °C. Après 2 heures, la réaction est terminée et le mélange est extrait avec une solution d'acétate de sodium, puis avec de la saumure jusqu'à la neutralité.

L'ester de Squalène N-hydroxysuccinimide (1.2 eq.), préalablement préparé par réaction d'acide squalénique et de NHS, en présence d'EDCI, est ajouté à la

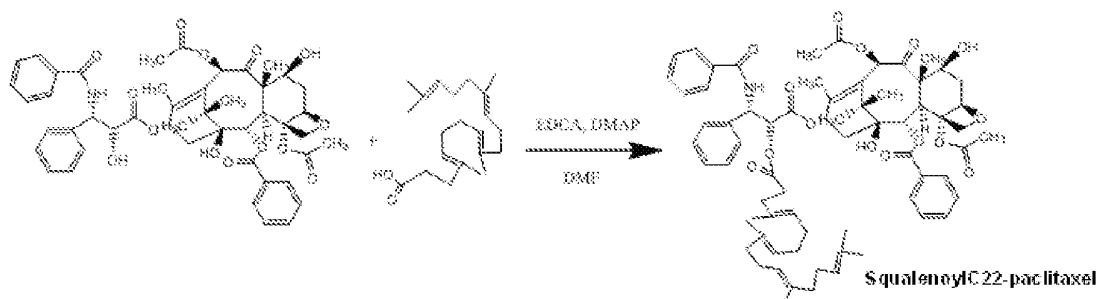
Paclitaxel-succinyl-Peg3-amine (1 eq.). De la triéthylamine (0.3 eq.) est ajoutée et le mélange réactif est agité, à température ambiante, pendant 6 heures. Après élimination du solvant, le produit brut est purifié au travers d'une colonne de gel de silice en utilisant un gradient DCM/éthanol afin d'obtenir le produit purifié, dont la pureté est contrôlée par analyse HPLC sur une colonne RP-18.

¹H-NMR (CDCl₃): d 8,13 (d, 2H, OC(O) o-ArH), 7,75 (d, 2H, NC(O) o-ArH), 7,62 (t, 1H, OC(O) p-ArH), 7,53±7,49 (bande, 3H), 7,43±7,35 (bande, 7H), 6,91 (t, 1H, NH), 6,35 (s, 1H, C(10)-H), 6,27 (t, 1H, C(13)-H), 5,99 (t, 1H, C(3')-H), 5,69 (d, 1H, C(2)-H), 5,30 (dd, 1H, C(7)-H), 5,44 (dd, 1H, C(2'-H)), 5,20 (s, 5H, C(sq)-H), 4,97 (d, 1H, C(5)-H) 4,39±4,25 (bande, 3H), 4,24±4,10 (bande, 7H), 3,96 (d, 1H), 3,85 (dd, 1H), 3,75 (m, 1H), 3,42 (t, 2H, sq CH₂-NH), 3,54 (m, 6H, CH₂-O), 3,37 (m, 4H, O-CH₂), 3,13 (m, 4H, CH₂-N), 2,61 (p, 1H, C(6)-H et m 4H succinyle CH₂), 2,46 (d, 3H, C(4)-OAc), 2,41 (m, 1H, C(14)-H), 2,29 et 2,20 (s 4H, CH₂ sq. acide), 2,23 (m, 1H, C(14)-H), 2,14 (d, 3H, C(10)-OAc), 2,01 (s, 3H, C(12)-CH₃), 2,00 (m, 16H, CH₂ sq), 1,97 (m, 1H, C(6)-H), 1,81 (s, 3H, C(8)-CH₃), 1,71 (m, 18H, C(sq)-CH₃), 1,41 (d, 3H), 1,21 (s, 3H, C(15)-CH₃), 1,16 (s, 3H, C(15)-CH₃).

Exemple 13

20

Synthèse du squalénoylC22-paclitaxel



A une solution d'acide squalénique-C22 dans du DMF sec sont ajoutés de l'EDCA (1.5 eq.), du DMAP (0.5 eq.) et du paclitaxel (1.6 eq.) dans du DMF. Après 5 heures, la réaction est interrompue avec un pH d'eau égal à 5,0 et extrait à l'aide de saumure.

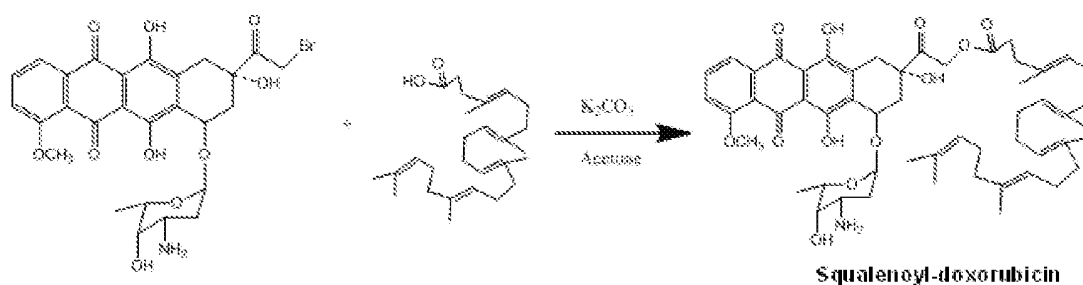
Le mélange brut est purifié par chromatographie sur SiO₂, élué avec du DCM/ acétate d'éthyle en utilisant un gradient optimisé. La fraction contenant le produit attendu est élue avec 10 % d'acétate d'éthyle. Les fractions pures de squalénoylC22-paclitaxel sont collectées et la pureté est contrôlée par analyse HPLC sur une colonne
 5 RP-18, à polarité de phase inversée élue avec un mélange acétonitrile/eau.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 8,13 (d, 2H, OC(O) o-ArH), 7,75 (d, 2H, NC(O) o-ArH), 7,62 (t, 1H, OC(O) p-ArH), 7,53±7,49 (bande, 3H), 7,43±7,35 (bande, 7H), 6,91 (t, 1H, NH), 6,35 (s, 1H, C(10)-H), 6,27 (t, 1H, C(13)-H), 5,99 (t, 1H, C(3')-H), 5,69 (d, 1H, C(2)-H), 5,30 (dd, 1H, C(7)-H), 5,44 (dd, 1H, C(2'-H)), 5,20 (s, 5H, C(sq)-H), 4,97 (d, 1H, C(5)-H) 4,39±4,25 (bande, 3H), 4,24±4,10 (bande, 7H), 3,96 (d, 1H), 3,85 (dd, 1H), 3,75 (m, 1H), 2,61 (p, 1H, C(6)-H), 2,46 (d, 3H, C(4)-OAc), 2,41 (m, 1H, C(14)-H), 2,29 et 2,35 (s 4H, CH₂ sq. acide), 2,23 (m, 1H, C(14)-H), 2,14 (d, 3H, C(10)-OAc), 2,01 (s, 3H, C(12)-CH₃), 2,00 (m, 16H, CH₂ sq), 1,97 (m, 1H, C(6)-H), 1,81 (s, 3H, C(8)-CH₃),
 10 1,71 (m, 15H, C(sq)-CH₃), 1,41 (d, 3H), 1,21 (s, 3H, C(15)-CH₃), 1,16 (s, 3H, C(15)-CH₃).

Exemple 14

Synthèse du 14-squalénoyl-doxorubicine

20



La doxorubicine en présence de brome et de triméthylorthoformate, forme du 14-bromo-13-diméthyle acétate de doxorubicine, qui, sous agitation avec de l'acétone, fournit de la 14-bromodoxorubicine. La bromodoxorubicine dissoute dans de l'acétone
 25 sec est mise à réagir avec de l'acide squalénique (3 eq.) en présence de carbonate de potassium. Après 20 heures, la réaction est filtrée, le solvant est évaporé et le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne SiO₂ (4:1, DCM-méthanol) afin d'obtenir de la 14-squalénoyl-doxorubicine.

¹H NMR (CDCl₃): 8,02 (d, 1H, H-3), 7,87 (d, 1H, H-1), 7,70 (t, 1H, , H-2), 5,46 (s, 1H, H-10), 5,3– 5,25 (m, 2H, H-14a, H-14b) et 5,20 (s, 5H, C(sq-H) 5,19 (s, 1H, H-7), 4,15 (q, 1H, H-50), 4,01 (s, 3H, OCH₃), 3,74 (m, 2H, H-30, H-40), 3,24 (d, 1H, H-10), 3,00 (d, 1H, H-10), 2,43 (m, 1H, H-8), 2,29 et 2,35 (s 4H, CH₂ sq. acide), 2,13 (m, 1H, H-8), 2,03 (m, 16H, CH₂ sq), 1,97 (m, 1H, H-20), 1,82 (m, 1H, H-20), 1,71 (m, 18H, C(sq)-CH₃), 1,29 (d, 3H, CH₃).

Exemple 15

Préparation et caractérisation de nanoparticules des dérivés synthétisés selon les exemples 10 à 14

Des nanoparticules de différents actifs sont préparées par nanoprécipitation. Dans le cas du paclitaxel, la solution éthanolique contenant le conjugué squalénoyl/paclitaxel (solution de base 5-10 mg/mL) est ajoutée, goutte-à-goutte, sous agitation (500 tpm) dans une solution de dextrose aqueuse à 5 %. La précipitation des nanoparticules survient spontanément. Les solvants organiques sont totalement évaporés à l'aide d'un Rotavapor[®] afin d'obtenir une suspension aqueuse de nanoparticules purs.

Concernant le squalénoyl-polyéthylène glycol (dans un ratio de 1:0.5), il est mélangé dans une solution éthanolique et les nanoparticules sont préparées selon la méthode précédemment décrite.

Pour la préparation de nanoparticules de squalénoyl-doxorubicine, on utilise un mélange de dichlorométhane et d'éthanol à la place de l'éthanol pur, mais le reste de la procédure est similaire à celle décrite ci-dessus.

La composition des nanoparticules formées à partir des conjugués précédemment décrits dans les exemples 10 à 14 est présentée dans le tableau ci-après :

Exemple No.	Ingrédients	Quantité
10	Squalénoylsuccinyl-paclitaxel	5,0 mg
	Squalénoyl-polyéthylène glycol (MM = 2369)	2,5 mg
	Dextrose	0,05 g
	Eau pour injection	q.s.p. 1 mL
11	Squalénoyldiglycolyl-paclitaxel	5,0 mg
	Dextrose	0,05 g
	Eau pour injection	q.s.p. 1 mL
12	Squalénoylsuccinyl-PEG340-paclitaxel	3 mg
	Dextrose	0,05 g
	Eau pour injection	q.s.p. 1 mL
13	SqualénoylC22-paclitaxel	2,5 mg
	Dextrose	0,05 g
	Eau pour injection	q.s.p. 1 mL
14	Squalénoyl-doxorubicine	2 mg
	Dextrose	0,05 g
	Eau pour injection	q.s.p. 1 mL

La taille moyenne des nanoparticules et l'indice de polydispersité des nanoparticules sont déterminés à une température de 20 °C par diffusion de la lumière avec un zetasizer (Malvern Instruments, UK). Les mesures sont réalisées après dilution de la suspension des nanoparticules dans de l'eau MilliQ®.

La taille des nanoparticules des dérivés squalénoyle du paclitaxel et de la doxorubicine et leur indice de polydispersité sont listés dans le tableau ci-dessous :

Exemple No.	Type de conjugués	Diamètre moyen des particules (nm)	Indice de polydispersité
10	Squalénoylsuccinyl-paclitaxel	250,9	0,061
11	Squalénoyldiglycolyl-paclitaxel	150,0	0,075
12	Squalénoylsuccinyl-PEG340-paclitaxel	643,9	0,081
13	SqualénoylC22-paclitaxel	239,3	0,077
14	Squalénoyl-doxorubicine	138,2	0,325

Exemple 16**Evaluation de l'activité anti-cancer *in vitro* des conjugués squalénoyle**

L'activité anti-cancer *in vitro* des conjugués du type squalénoyle/paclitaxel sous la forme de nanoparticules est réalisée sur une lignée cellulaire tumorale pulmonaire murine Madison's 109 (M109). Les cellules M109 sont cultivées dans RPMI 1640, supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal, 50 U.ml⁻¹ de pénicilline et 50 µg.ml⁻¹ de streptomycine et 2 mM de L-glutamine. Cette analyse est réalisée en utilisant le test au bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-3,5-diphényle tétrazolium (MTT), mesurant l'activité déshydrogénase mitochondriale. Les cellules en phase de croissance exponentielle sontensemencées sur plaque 96-puits et pré-incubées pendant 24 heures à 37 °C dans une atmosphère humidifiée avec 5 % de CO₂ dans l'air. Différentes dilutions de nanoparticules de paclitaxel sont ajoutées aux cellules dans le milieu de culture. Chaque dilution est testée trois fois. Après 72 heures à 37 °C, 200 µL de solution MTT dans le milieu de culture cellulaire (0,5 mg/ml) sont ajoutés dans chaque puits. Après incubation pendant 2 heures 30 à 37 °C, le milieu de culture est enlevé et les cristaux de formazan obtenus sont dissous dans 200 µL d'une solution d'extraction (diméthyle sulfoxide). Le pouvoir absorbant de la matière colorante transformée, qui est proportionnel au nombre de cellules viables, est mesuré à 570 nm en utilisant un lecteur de microplaques (Metertech Σ 960, Fisher Bioblock, Illkirch, France). Le pourcentage de cellules survivantes est calculé en faisant le ratio du pouvoir absorbant entre les cellules traitées et celles non traitées.

L'activité anti-cancer *in vitro* des nanoparticules squalénoyl-doxorubicine est évaluée sur une lignée cellulaire leucémique murine L1210 WT. Les cellules sont cultivées dans RPMI 1640 supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal, 50 U.ml⁻¹ de pénicilline et 50 µg.ml⁻¹ de streptomycine et 2 mM de L-glutamine. L'évaluation est réalisée selon le protocole décrit ci-dessus.

Les concentrations d'inhibition 50 % (CI₅₀) des nanoparticules des différents conjugués de type squalénoyle/paclitaxel et squalénoyl-doxorubicine sont listées dans le tableau ci-dessous :

Exemple No.	Type de nanoparticule	(CI ₅₀) (μM)
10	Squalénoylsuccinyl-paclitaxel	0,072
11	Squalénoyldiglycolyl-paclitaxel	0,175
12	Squalénoylsuccinyl-PEG340-paclitaxel	0,490
13	SqualénoylC22-paclitaxel	7,300
14	Squalénoyl-doxorubicine	0,291

Exemple 17

5 Evaluation de l'activité anti-cancer *in vivo* des nanoparticules d'un dérivé squalénoyldiglycolyl-paclitaxel obtenu selon l'Exemple 11

Des souris CD2F1 (âgées de 4-5 semaines) pesant environ 15-18 g ont été utilisées pour cette étude. Les souris sont nourries avec de la nourriture standard pour
10 souris et de l'eau *ad libitum*. Le modèle tumorale sous-cutané M109 (tumeur pulmonaire murine) est développé en injectant les cellules M109 à croissance exponentielle (1x10⁶ cellules) en suspension, sous la peau, dans la portion basse de l'abdomen des souris. Une tumeur palpable (environ 50-100 mm³) est laissée croître au site d'injection. Les souris porteuses de tumeur sont divisées en 2 groupes de 5-6, à savoir les non-traitées et les
15 traitées avec des nanoparticules squalénoyldiglycolyl-paclitaxel 160 mg.kg⁻¹ (injectés en intraveineuse pendant 5 jours consécutifs). Les souris sont régulièrement contrôlées pour vérifier la différence du volume des tumeurs, et ainsi évaluer l'efficacité anti-cancer.

Les nanoparticules squalénoyldiglycolyl-paclitaxel démontrent une activité anti-cancer en contrôlant la progression des tumeurs M109 implantées
20 hypodermiquement chez les souris.

Ces résultats sont présentés en figure 2.

Exemple 18

25 Evaluation de l'activité anti-cancer *in vivo* des nanoparticules d'un dérivé squalénoyl-doxorubicine, obtenu selon l'Exemple 14

Des souris DBA/2 mice (âgées de 4 à 5 semaines) pesant environ 15-18 g ont été utilisées pour cette étude. Comme pour l'Exemple 17, les souris sont nourries avec de la nourriture standard pour souris et de l'eau *ad libitum*. Le modèle de leucémie métastatique agressive L1210 (une leucémie murine) est développé en injectant par voie
30 intraveineuse les cellules à croissance exponentielle L1210 (0,1x10⁶ cellules) en

suspension, dans les souris. Les souris porteuses de la tumeur sont divisées en 2 groupes de 5-6, à savoir les non traitées et les traitées avec des nanoparticules squalénoyl-doxorubicine (13 mg.kg^{-1} , injectées par voie intraveineuse aux jours 1, 7 et 14, après injection des cellules tumorales). Après traitement, les souris sont contrôlées
5 régulièrement pour vérifier les différences de poids et le taux de survie, paramètres permettant d'évaluer l'efficacité de l'activité anti-cancer.

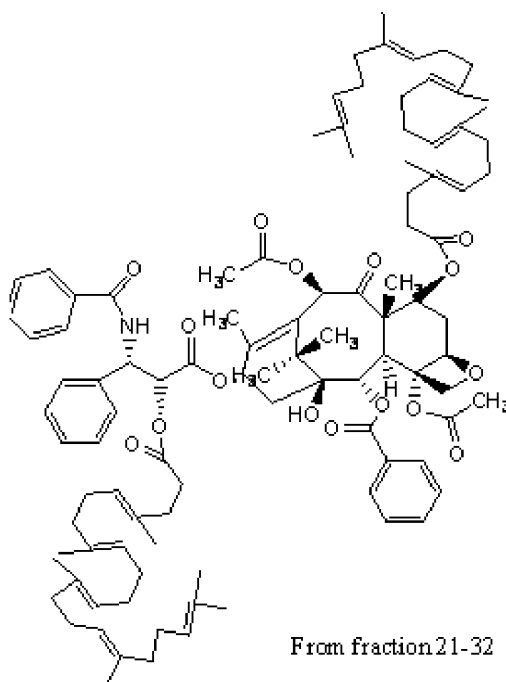
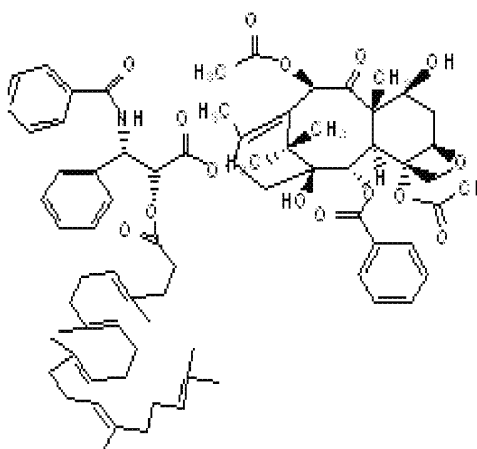
Dans ce modèle, qui représente la forme métastatique agressive de cancer, les nanoparticules de squalénoyl-doxorubicine démontrent une activité anti-cancer efficace (Figure 3) et un taux de survie des souris porteuses de leucémie amélioré (Figure
10 4).

REVENDICATIONS

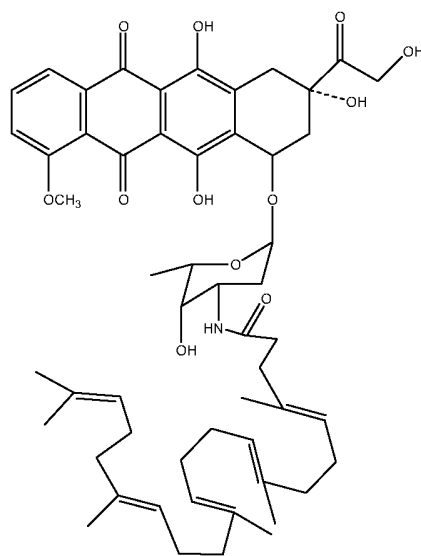
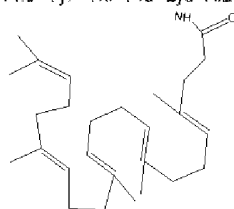
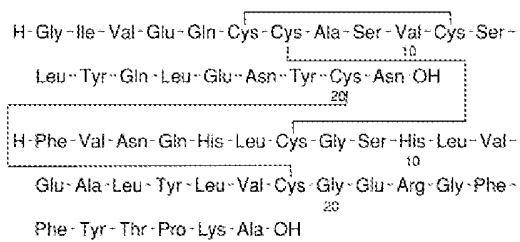
1. Dérivé hydrodispersible d'un actif thérapeutique de faible solubilité aqueuse formé d'au moins une molécule dudit actif couplée de manière covalente à au moins une molécule d'un composé hydrocarboné à structure squalénique ou analogue, ledit actif possédant une solubilité inférieure à 100 µg/ml dans de l'eau pure mesurée à température ambiante.
2. Dérivé selon la revendication 1 comprenant au moins un radical à structure squalénique.
3. Dérivé selon la revendication 1 ou 2 comprenant au moins deux radicaux à structure squalénique, identiques ou différents.
4. Dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dont ledit actif possède une solubilité inférieure à 25 µg/ml dans de l'eau pure mesurée à température ambiante, en particulier inférieure à 20 µg/ml voire inférieure à 10 µg/ml et plus particulièrement inférieure à 5 µg/ml.
5. Dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dont ledit actif est choisi parmi les immunosuppresseurs, les agents antitumoraux chimiothérapeutiques, les agents antiangiogéniques, les antiviraux, antibactériens, antibiotiques et antiparasitaires, les substances agissant sur le métabolisme des sucres, les peptides, les lipides, les agents agissant sur les canaux calciques, les antiflogistiques non stéroïdiens et les composés peptidiques.
6. Dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dont ledit actif est un agent antitumoral chimiothérapeutique choisi parmi les taxoïde, la doxorubicine et l'épirubicine.
7. Dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dont ledit actif est choisi parmi les taxanes ou taxoïdes.
8. Dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dont ledit actif est choisi parmi le doxetaxel, paclitaxel et un de leurs dérivés.
9. Dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dont ledit actif est l'insuline.
10. Dérivé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le lien covalent existant entre ledit actif thérapeutique de faible solubilité aqueuse et une

molécule d'un composé hydrocarboné à structure squalénique ou analogue est figuré par un bras de liaison.

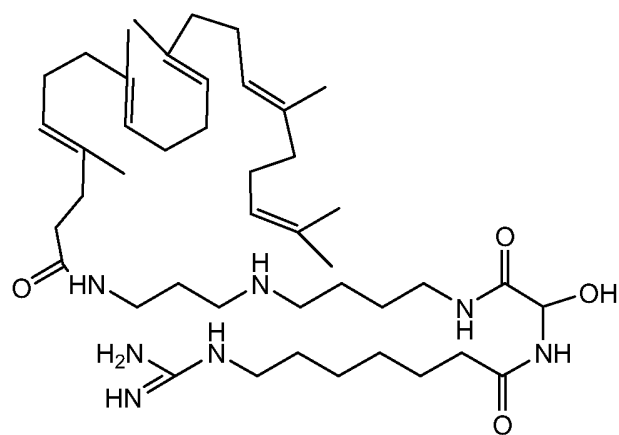
11. Dérivé selon la revendication précédente dans lequel le bras de liaison est choisi parmi les motifs (poly)aminoacides, polyols, saccharidiques, et polyéthylèneglycol (polyétheroxides) de faible poids moléculaire.
- 5 12. Dérivé selon l'une quelconque des revendications précédentes choisi parmi :



From fraction 21-32



et



13. Nanoparticules hydrodispersibles d'au moins un actif thérapeutique de faible solubilité aqueuse dans lesquelles ledit actif y est présent sous une forme associée à au moins un composé hydrocarboné à structure squalénique ou analogue.

5 14. Nanoparticules selon la revendication 13, formées à partir d'un dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.

15. Nanoparticules selon la revendication 13 ou 14, possédant une taille moyenne variant de 30 à 650 nm, en particulier de 30 nm à 500 nm, et en particulier de 50 à 250 nm, voire de 100 à 200 nm.

10 16. Dispersion aqueuse de nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 13 à 15.

17. Procédé de préparation de nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

15 - la solubilisation d'au moins un dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 dans au moins un solvant organique à une concentration suffisante pour obtenir, lors de l'ajout du mélange correspondant, sous agitation, à une phase aqueuse, la formation instantanée de nanoparticules en suspension dans ladite phase aqueuse, et

- le cas échéant, l'isolement des dites nanoparticules.

20 18. Procédé selon la revendication précédente, dans lequel le solvant organique est un alcool.

19. Procédé selon la revendication 17 ou 18, caractérisé en ce qu'il ne met pas en œuvre de tensioactif.

25 20. Composition pharmaceutique comprenant à titre de matière active, au moins un dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 ou des nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 13 à 15 en association avec au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

FIGURE 1

FIGURE 1A

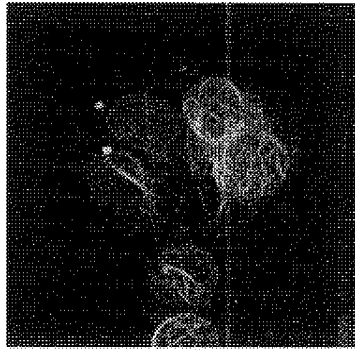


FIGURE 1B

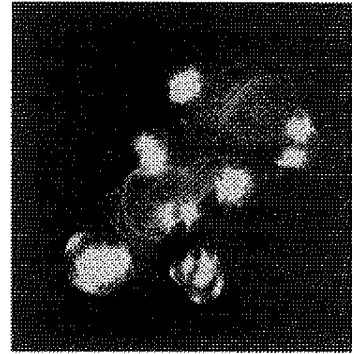
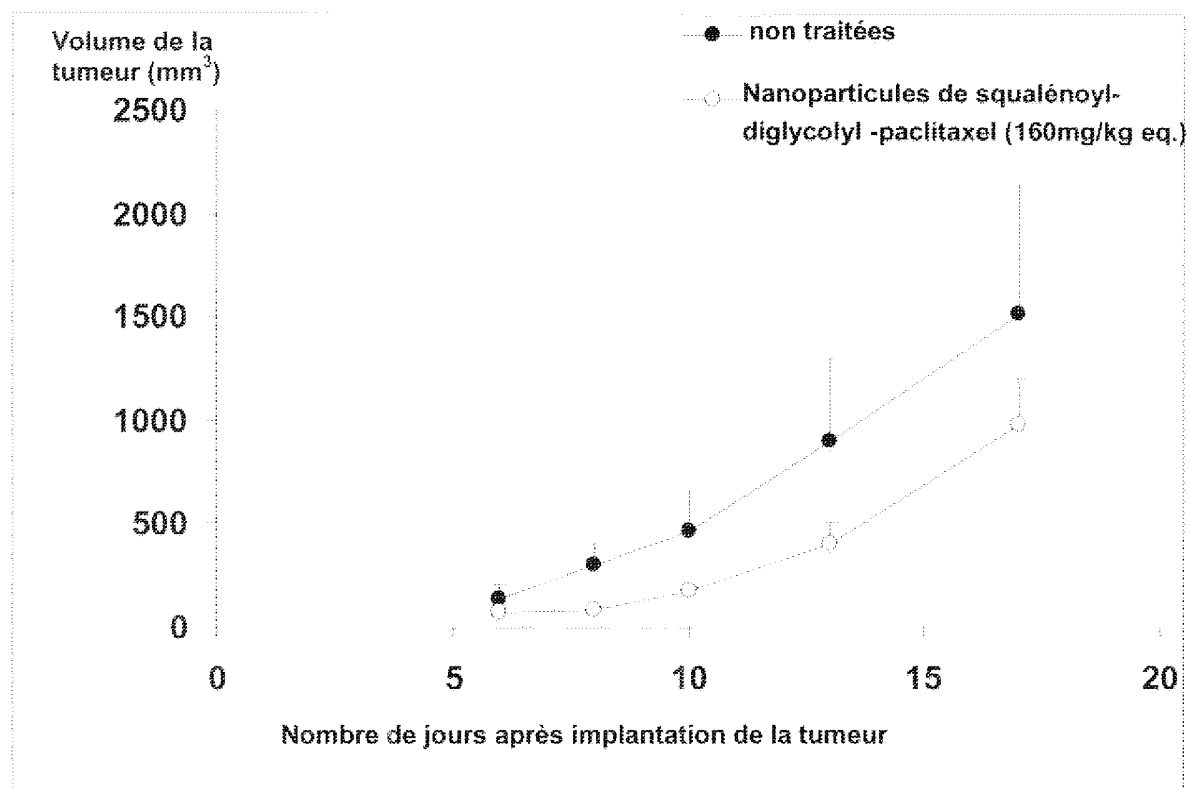


FIGURE 2

3/4

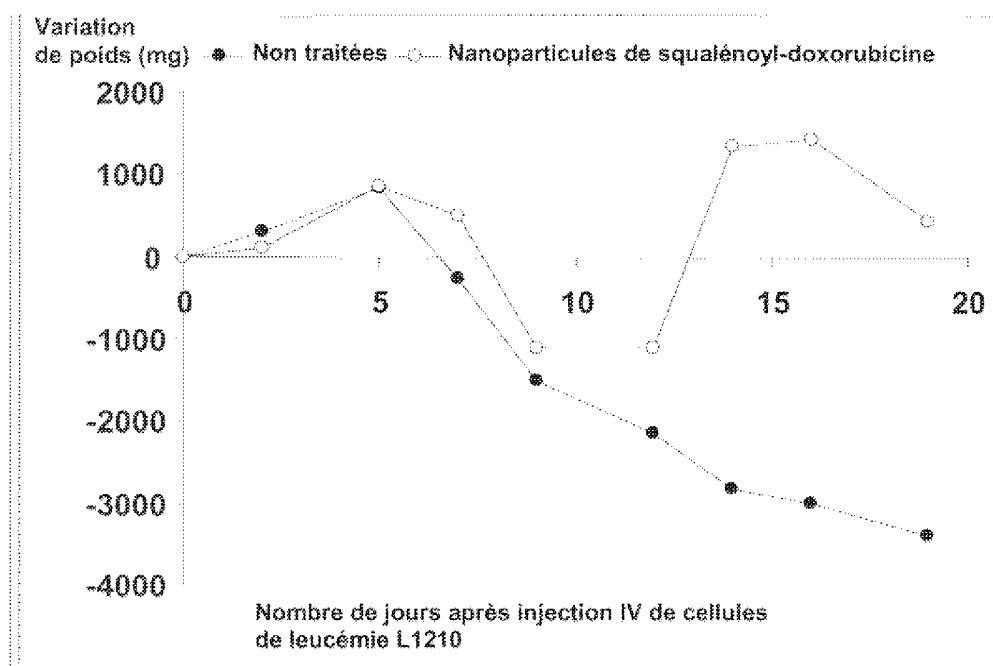
FIGURE 3

FIGURE 4